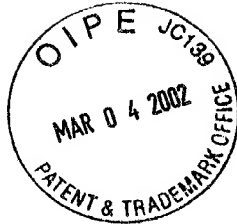


03500.015961



PATENT APPLICATION

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

In re Application of:)
TADASHI OKAMOTO, ET AL.) Examiner: Not Yet Assigned
Application No.: 09/988,873) Group Art Unit: 1645
Filed: November 21, 2001)
For: TERMINAL LABELED PROBE)
ARRAY AND METHOD OF)
MAKING IT) March 1, 2002

Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

CLAIM TO PRIORITY

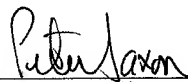
Sir:

Applicants hereby claim priority under the International Convention and all rights to which they are entitled under 35 U.S.C. § 119 based upon the following Japanese Priority Application. A certified copy of the priority document is enclosed.

357446/2000, filed November 24, 2000

Applicants' undersigned attorney may be reached in our New York office by telephone at (212) 218-2100. All correspondence should continue to be directed to our address given below.

Respectfully submitted,



Attorney for Applicants

Registration No. 24947

FITZPATRICK, CELLA, HARPER & SCINTO
30 Rockefeller Plaza
New York, New York 10112-3801
Facsimile: (212) 218-2200
240999

CFO 15961 US/shi



特許庁

PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出願年月日

Date of Application:

2000年11月24日

出願番号

Application Number:

特願2000-357446

出願人

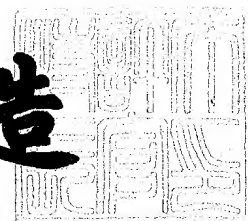
Applicant(s):

キヤノン株式会社

2001年12月14日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及川耕造



出証番号 出証特2001-3108559

【書類名】 特許願

【整理番号】 3906114

【提出日】 平成12年11月24日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12Q 1/68

【発明の名称】 末端標識プローブアレイとその作製方法、並びにそれを用いた標的物質量の評価方法

【請求項の数】 15

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 岡本 尚志

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 山本 伸子

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社
社内

【氏名】 鈴木 智博

【特許出願人】

【識別番号】 000001007

【氏名又は名称】 キヤノン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100088328

【弁理士】

【氏名又は名称】 金田 暢之

【電話番号】 03-3585-1882

【選任した代理人】

【識別番号】 100106297

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊藤 克博

【選任した代理人】

【識別番号】 100106138

【弁理士】

【氏名又は名称】 石橋 政幸

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 089681

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 末端標識プローブアレイとその作製方法、並びにそれを用いた標的物質量の評価方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するためのプローブをその一部を固定して、該プローブを構成するためのユニットを逐次的に結合していく、逐次合成の際に、該逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合することを特徴とする末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項2】 前記プローブが核酸である請求項1の末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項3】 前記核酸がDNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸である請求項2に記載の末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項4】 前記核酸がDNAであり、前記逐次合成が下記の合成ステップよりなるフォスフォロアミダイト法である請求項3に記載の末端標識プローブアレイの合成方法。

(1)固相担体(ガラス基板等)表面にリンカーを介して結合されている水酸基の保護基を除去する工程。

(2)所望の塩基を有する第一番目のヌクレオチドを形成すべきアミダイトモノマーの3'側で(1)の水酸基と結合する工程。

(3)(1)の水酸基のうち(2)の工程で未反応なものをキャッピングする工程。

(4)(2)で結合したアミダイトをフォスファイトからフォスフェイトへ酸化する工程。

(5)(2)で結合したアミダイトの5'側に結合した水酸基の保護基を除去する工程。

(6)(2)から(4)の工程を所望の塩基長、塩基配列に対して3'→5'方向へ繰り返す工程。

【請求項5】 前記プローブが蛋白質である請求項1に記載の末端標識プロ

ープアレイの合成方法。

【請求項 6】 前記プローブがオリゴペプチドである請求項 1 に記載の末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項 7】 前記プローブの末端に結合した標識物質が蛍光物質である請求項 1 から 6 に記載の末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項 8】 前記プローブの末端に結合した標識物質が蛍光色素である請求項 7 に記載の末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項 9】 前記プローブの末端に結合した標識物質が、標的物質に対する標識物質と異なる請求項 1 から 8 に記載の末端標識プローブアレイの合成方法。

【請求項 10】 プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するための、それぞれ異なるプローブが逐次合成され、逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物が結合されていることを特徴とする末端標識プローブアレイ。

【請求項 11】 請求項 1 から 9 に記載の方法によって作製された、請求項 10 に記載の末端標識プローブアレイ。

【請求項 12】 請求項 11 に記載の末端標識プローブアレイの、それぞれのマトリクスの標識物質量を測定する、最終段階まで逐次合成された各マトリクスのプローブの量の評価方法。

【請求項 13】 請求項 12 に記載の量的に評価されたプローブの量と、該プローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較する標的化合物の量の評価方法。

【請求項 14】 逐次合成の第一段階において基板表面の所定のマトリクスに結合され、その後の伸長反応を行わない標識物質の量と、最終段階において結合された標識物質の量を比較する請求項 12 に記載のプローブの量の評価方法。

【請求項 15】 請求項 11 に記載の末端標識プローブアレイの所定の部位のマトリクスのプローブに捕捉された標識標的化合物の標識化合物の量と、最終段階において結合された標識物質の量と、逐次合成の第一段階において基板表面に

結合された標識物質の量とを比較する標的化合物の量の評価方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、標識プローブアレイ、該標識プローブアレイの作製方法、及び、該標識プローブアレイを用いた標的物質量の評価方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、複数のプローブを基板方面にアレイ状に配置した、いわゆるプローブアレイを用いて標的物質を精密に評価する方法が精力的に検討されている。その代表的な例としてDNAプローブアレイをあげることができる。DNAプローブアレイを用いることにより、例えば、複数の標的遺伝子の存在を塩基配列レベルで、また、塩基配列そのものとして解析することが可能となる。

【0003】

プローブアレイの作製方法は大きく分けると二つの方法がある。

【0004】

第一の方法は、プローブがDNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)、蛋白質、オリゴペプチドのように、ヌクレチオドやアミノ酸の配列が重要な意味を持ち、かつ、化学的に伸長合成な物質である場合、これらを固相アレイ基板上に逐次的に合成していく方法である。

【0005】

このような方法の一例として米国特許公報5,445,966には、光分解性の保護基とフォトリソグラフィー法を用いた基板上でのDNAプローブアレイの合成方法が示されている。また、他の例として米国特許公報5,474,796にはヌクレオチドモノマーをインクジェット法により供給する方法も示されている。

【0006】

第二の方法は上述の物質の他に、化学的に合成できない物質にも適用できるので、予め合成、または、調製された物質をプローブアレイ基板の各マトリクス部位に、マイクロディスペンサー法、ピントランスファー法、インクジェット法

等により供給する方法である。

【0007】

第二の方法によれば予め精製し、量的にコントロール可能なプローブを用いるので、プローブの純度は十分確保でき、また、基板表面と反応させる濃度も自由に決めることができる。結果として基板表面に存在することになる各プローブ量のある程度正確に見積もることができ、プローブアレイを用いる標的物質の検出の信頼性が向上する。一方で第二の方法によればプローブアレイに必要な種類のプローブを全て、予め合成する必要と、それをプローブアレイ基板へ供給、反応させる必要がある。プローブアレイに必要なプローブの種類は、場合により数十万種になることもあり、これらを全て、予め合成し、基板へ供給、反応させるにはかなりの困難をとらなう。

【0008】

他方、第一の方法によれば、必要な種類のプローブを基板上で合成し、それを標的物質との反応に用いることができ、予め合成または調製したプローブを基板上に固定する操作を省略できる。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

ところが、上述した第一の方法における検出感度や信頼性を更に向上させようとするには、以下のような問題がある。

【0010】

(1) 逐次合成の各段階での合成収率は 100% ではないので、最終的な合成収率は場合によっては 5% 程度になる場合がある。これは標的物質を検出する際の感度の低下に直結する。

【0011】

(2) 同様の理由で、プローブアレイの各マトリクスには最終的に望まれる長さのプローブの他に、短い長さの物質が含まれることになり、これは、標的物質の検出時の信頼性の低下の原因となる。

【0012】

(3) 基板上で合成した結果、各マトリクスのプローブの量を測定することがで

きない。これも標的物質の検出時の信頼性の低下の原因となる。

【0013】

(4) 上述のように、逐次合成の各段階での合成収率は 100%ではなく、また、各段階で、また、各マトリクス部位でばらつくので、最終的に得られる各プローブの量は広い範囲でばらつくことになる。これも標的物質の検出時の信頼性の低下の原因となる。

【0014】

【課題を解決するための手段】

本発明は、上記従来技術の課題を解決するためになされたものである。

【0015】

すなわち、プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するためのプローブをその一部を固定して逐次合成する際に、該逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合することを特徴とする末端標識プローブアレイの合成方法についてのものである。

【0016】

また、プローブアレイ基板表面の複数のマトリクス部位に、標的物質を捕捉するための、それぞれ異なるプローブが逐次合成され、逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって所望の鎖長まで伸長されたプローブの末端に標識化合物が結合されていることを特徴とする、とりわけ前記記載の方法によって作製された末端標識プローブアレイである。

【0017】

さらに、前記記載の末端標識プローブアレイの、それぞれのマトリクスの標識物質量を測定する、最終段階まで逐次合成された各マトリクスのプローブの量の評価方法である。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明では逐次合成の最終工程において、量的に測定可能な標識物質を導入することを特徴とする。

【0019】

本発明の逐次合成方法とは、数個から百個程度のユニット(例えばDNAであればヌクレオチド、タンパク質であればアミノ酸残基)からなる鎖状のオリゴマーを、所望のユニットを逐次的に結合合成していく方法であって、オリゴヌクレオチド、オリゴペプチド、PNAそれぞれに関してすでに一般的に用いられている手法をそのまま用いることができる。例えばDNA(オリゴヌクレオチド)の合成を例に挙げると、現在自動合成機で最も一般的に用いられている方法はフォスフォロアミダイト法であり、以下の合成ステップよりなる。

- (1)固相担体(ガラス基板等)表面にリンカーを介して結合されている水酸基の保護基を除去する工程。
- (2)所望の塩基を有する第一番目のヌクレオチドを形成すべきアミダイトモノマーの3'側で(1)の水酸基と結合する工程。
- (3)(1)の水酸基のうち(2)の工程で未反応なものをキャッピングする工程。
- (4)(2)で結合したアミダイトをフォスファイトからフォスフェイトへ酸化する工程。
- (5)(2)で結合したアミダイトの5'側に結合した水酸基の保護基を除去する工程。
- (6)(2)から(4)の工程を所望の塩基長、塩基配列に対して3'→5'方向へ繰り返す工程。
- (7)核酸塩基の保護基を除去する工程。

【0020】

プローブに関しては特に限定されることはないが、核酸、DNA、オリゴヌクレオチド、ペプチド核酸(PNA)、蛋白質、オリゴペプチドなどを例にあげることができる。

【0021】

また、プローブアレイを用いる標的物質の検出においては、標的物質を蛍光色素で標識するのが一般的な手段として用いられているので、そのような場合にはプローブの標識物質にも蛍光色素を用いれば、同じ測定器を用いて検出することができ都合がよい。

【0022】

その他の標識物質も用いることができるが、標的物質の検出の際の妨げにならないようにその種類を適宜選択する必要がある、そういう意味からも標的物質に結合させた標識物質とプローブに結合させた標識物質は異なるものであることが望ましい。

【0023】

標識物質が共に蛍光色素である場合には、それぞれの励起波長と、蛍光波長が異なることが望ましく、例えば、片方がFITCで他方がローダミン、片方がCY3(アマシャムファルマシアバイオテク(株))で他方がCY5(アマシャムファルマシアバイオテク(株))などの例をあげることができる。

【0024】

プローブの固相での逐次合成の際には、一段伸長反応を行った後に、伸長せずに未反応のまま残った反応サイト(官能基)を反応性のないものに替える処理(キャッピング)をする。例えばDNAの固相合成では反応サイトの水酸基がアセチル化されることにより反応性を失う。

【0025】

従って本発明において標識物質が導入されるのは最終段階(所望の鎖長)まで伸長されたプローブのみということになり、結果として、それぞれのマトリクスのプローブの標識物質の量を測定することにより、各マトリクスのプローブの量を評価することが可能となる。

【0026】

この量的に評価されたプローブの量と、これらプローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較することにより標的物質の量の測定における各プローブ間の相対的補正を行うことができる。

【0027】

また、絶対的な標的物質の量の評価方法として、本発明では、逐次合成の第一段階において基板表面の所定の位置に結合され、その後の伸長反応を行わないマトリクス部位の標識物質の量と、伸長反応を行なう各マトリクス部位での最終段階において伸長合成されたプローブに結合された標識物質の量を比較し、第一段

階の反応前に形成した基板表面の官能基の量に対する各マトリクスのプローブ量を評価し、この量的に評価されたプローブ量と、これらプローブに捕捉された標的物質の標識物質の量を比較することにより標的物質の量の測定における絶対量の把握と、各プローブ間の相対的補正を同時に行うことができる。

【 0 0 2 8 】

本発明における末端標識プローブアレイを作製する際の各操作には前記の米国特許公報のいずれに記載の方法でもよく、他にも従来の技術を用いることが可能である。

【 0 0 2 9 】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明を具体的に説明する。

【 0 0 3 0 】

(実施例 1) 末端標識 DNA プローブアレイの作製

(1) 合成石英基板 (25.4mm×25.5mm 厚さ 0.5mm) を、超音波洗浄専用洗剤 GP-II (ブランソン社製) の 10% 水溶液で 20 分間超音波洗浄した。超純水で適宜洗浄した後、1N 水酸化ナトリウム水溶液 (80℃) に浸漬し、同様に超純水で洗浄、乾燥し、ついで、UV オゾン処理を行い、表面を清浄化した。

【 0 0 3 1 】

(2) 次に、カーボンブラックを含有した DEEP-UV レジスト (新日鉄化学株式会社 ブラックマトリクス用ネガ型レジスト BK-739P) を、スピncer ーターで膜厚 5 μ m になるように塗布した。この基板をホットプレートで 80℃ で 5 分間加熱し硬化させた。このレジスト膜に DEEP-UV 露光装置を使用し、1cm×1cm の領域に、100 μ m 間隔で、100 μ m×100 μ m の正方形のマトリクス部位が図 1 のように等間隔で配置されるパターンに対応する所定のパターンマスクを用いてプロキシミティー露光し、ついで、無機アルカリ水溶液の現像液で、スピン現像機を用いて現像し、さらに、超純水でリンス処理し、現像液を完全に除去し、その後、スピン乾燥機を用いて簡単に乾燥した後、クリーンオープン中で、180℃、30 分加熱し、レジストを本硬化させ、所定のレジスト膜で囲まれた基板表面からなるマトリクス部位を 2500 個形成した。なお、本実施例で形成した

各マトリクス部位の容積は50 pLと計算される。

【0032】

(3)エポキシ基を有するシランカップリング剤(KBM403: γ -グリシドキシプロピルトリメトキシシラン、信越化学工業株式会社)の1%水溶液を予め室温で1時間攪拌し加水分解した。この溶液に前記マトリクス部位を形成した基板を1時間浸漬し、ついで、超純水で適宜洗浄後、120℃で1時間加熱した。この処理により前記マトリクス部位にエポキシ基が結合した。この基板をさらにヘキサエチレングリコールで処理することにより、前記マトリクス部位にオリゴヌクレオチドを結合するための水酸基を導入した基板を得た。

【0033】

(4)基板上でのオリゴヌクレオチドの合成は通常のアミダイト法によって行った。上記基板を収納可能なポリプロピレン製のチャンバーを製作し、DNA合成機(ABI社製 381A)のカラム部分に装着した。アミダイトモノマーとアクティベーター以外の供給と、その後の洗浄、乾燥以外の合成工程は、この自動合成機によって行った。アミダイトモノマーとアクティベーターの供給にはインクジェットに用いられるピエゾ素子を改造して用いた。インクの代わりにアミダイトモノマー4種とアクティベーターのアセトニトリル溶液を用いて、装置をドライボックス(アルゴン)中で操作して各溶液を上記基板のマトリクス部位に位置を制御して供給した。なお、ピエゾ素子から一度に供給される液の量は平均的に24 pLである。

【0034】

(5)基本的には2500すべてのマトリクス部位に異なる配列オリゴヌクレオチドを合成することが可能であるが、本実施例では発癌関連遺伝子p53の二つのアミノ酸残基のうちの計3個所の塩基の全ての組み合わせを含む以下の64種のオリゴヌクレオチド、すなわちDNAプローブ合成した。得られたDNAプローブアレイ基板を30%アンモニア水に室温で12時間浸漬し、核酸塩基の脱保護を行った。

合成したDNAプローブ(No.1~No.64)の塩基配列

合成したDNAプローブ(No.1~No.64)の塩基配列

- No.1. 5'-GATGGGACTCAAGTTCAT-3'
- No.2. 5'-GATGGGACTCAGGTTCAT-3'
- No.3. 5'-GATGGGACTCACGTTCAT-3'
- No.4. 5'-GATGGGACTCATGTTCAT-3'
- No.5. 5'-GATGGGACTCGAGTTCAT-3'
- No.6. 5'-GATGGGACTCGGGTTCAT-3'
- No.7. 5'-GATGGGACTCGCGTTCAT-3'
- No.8. 5'-GATGGGACTCGTGTTTCAT-3'
- No.9. 5'-GATGGGACTCCAGTTCAT-3'
- No.10. 5'-GATGGGACTCCGGTTCAT-3'
- No.11. 5'-GATGGGACTCCCGTTCAT-3'
- No.12. 5'-GATGGGACTCCTGTTCAT-3'
- No.13. 5'-GATGGGACTCTAGTTCAT-3'
- No.14. 5'-GATGGGACTCTGGTTCAT-3'
- No.15. 5'-GATGGGACTCTCGTTCAT-3'
- No.16. 5'-GATGGGACTCTTGTTTCAT-3'
- No.17. 5'-GATGGGGCTCAAGTTCAT-3'
- No.18. 5'-GATGGGGCTCAGGTTCAT-3'
- No.19. 5'-GATGGGGCTCACGTTCAT-3'
- No.20. 5'-GATGGGGCTCATGTTCAT-3'
- No.21. 5'-GATGGGGCTCGAGTTCAT-3'
- No.22. 5'-GATGGGGCTCGGGTTCAT-3'
- No.23. 5'-GATGGGGCTCGCGTTCAT-3'
- No.24. 5'-GATGGGGCTCGTGTTTCAT-3'
- No.25. 5'-GATGGGGCTCCAGTTCAT-3'
- No.26. 5'-GATGGGGCTCCGGTTCAT-3'
- No.27. 5'-GATGGGGCTCCCGTTCAT-3'

- No.28. 5'-GATGGGGGCTCCTGTTCAT-3'
- No.29. 5'-GATGGGGGCTCTAGTTCAT-3'
- No.30. 5'-GATGGGGGCTCTGGTTCAT-3'
- No.31. 5'-GATGGGGGCTCTCGTTCAT-3'
- No.32. 5'-GATGGGGGCTCTTGTTTCAT-3'
- No.33. 5'-GATGGGGCCTCAAGTTCAT-3'
- No.34. 5'-GATGGGGCCTCAGGTTCAT-3'
- No.35. 5'-GATGGGGCCTCACGTTCAT-3'
- No.36. 5'-GATGGGGCCTCATGTTCAT-3'
- No.37. 5'-GATGGGGCCTCGAGTTCAT-3'
- No.38. 5'-GATGGGGCCTCGGGTTCAT-3'
- No.39. 5'-GATGGGGCCTCGCGTTCAT-3'
- No.40. 5'-GATGGGGCCTCGTGTTTCAT-3'
- No.41. 5'-GATGGGGCCTCCAGTTCAT-3'
- No.42. 5'-GATGGGGCCTCCGGTTCAT-3'
- No.43. 5'-GATGGGGCCTCCCGTTCAT-3'
- No.44. 5'-GATGGGGCCTCCTGTTCAT-3'
- No.45. 5'-GATGGGGCCTCTAGTTCAT-3'
- No.46. 5'-GATGGGGCCTCTGGTTCAT-3'
- No.47. 5'-GATGGGGCCTCTCGTTCAT-3'
- No.48. 5'-GATGGGGCCTCTTGTTTCAT-3'
- No.49. 5'-GATGGGTCTCAAGTTCAT-3'
- No.50. 5'-GATGGGTCTCAGGTTCAT-3'
- No.51. 5'-GATGGGTCTCACGTTCAT-3'
- No.52. 5'-GATGGGTCTCATGTTCAT-3'
- No.53. 5'-GATGGGTCTCGAGTTCAT-3'
- No.54. 5'-GATGGGTCTCGGGTTCAT-3'
- No.55. 5'-GATGGGTCTCGCGTTCAT-3'
- No.56. 5'-GATGGGTCTCGTGTTTCAT-3'

No.57. 5'-GATGGGGTCTCCAGTTCAT-3'

No.58. 5'-GATGGGGTCTCCGGTTCAT-3'

No.59. 5'-GATGGGGTCTCCCGTTCAT-3'

No.60. 5'-GATGGGGTCTCCTGTTTCAT-3'

No.61. 5'-GATGGGGTCTCTAGTTCAT-3'

No.62. 5'-GATGGGGTCTCTGGTTCAT-3'

No.63. 5'-GATGGGGTCTCTCGTTCAT-3'

No.64. 5'-GATGGGGTCTCTTGTTTCAT-3'

図1は作製したDNAアレイ基板上のDNAプローブの塩基配列とその配置、および、後にハイブリダイゼーションに用いるテトラメチルローダミン標識モデル標的DNAの塩基配列を示したものである。配列No.65は標的DNAの塩基配列、他の配列は配列No.65に対して相補的であるが、下線部の3塩基については、AGCTすべての組み合わせをもったもの、すなわち、 $4^3=64$ とおりの配列である。なお、上記プローブの3塩基は、配列No.65の下線部に対応している。また、各配列のNの部分はそれぞれ四角で形どられた部分の上部に書かれた塩基に対応している。結果として、基板上の各DNAプローブは図1に示したように、標的DNA配列に対して、完全に相補的(No.42)、あるいは、1塩基ミスマッチ、2塩基ミスマッチ、3塩基ミスマッチを有するものとなる。

【0035】

(6)合成した全てのDNAプローブの5'末端にはフルオロセインフォスフォロアミダイト(グレンリサーチ社)をもちいて蛍光色素であるフルオロセインを結合した。また、他の1個所のマトリクス部位には直接、上記アミダイトを用いてフルオロセインを結合した。すなわち第一段階の所望の塩基を有するアミダイトの代わりにフルオロセインフォスフォロアミダイトを用いてフルオロセインを結合した。なお、このものには原理的に次段階以降の伸長反応は進行しない。

【0036】

(実施例2) 実施例1で合成したDNAプローブアレイの蛍光定量。

【0037】

各マトリクス部位からのフルオロセイン由来の蛍光は蛍光顕微鏡 ECLIPSE 800 (株式会社ニコン、対物レンズ CFIPlanApo 20×) とイメージインテンシファイヤー付き CCD カメラ C2400-87 (浜松ホトニクス株式会社) で取り込み、画像処理装置 Argu50 (浜松ホトニクス株式会社) を用いて定量した。なお、イメージインテンシファイヤーの増幅度は $HV=2.0$ とし、積算回数は 64 回、蛍光顕微鏡のフィルターブロックはフルオロセイン測定用の B-2 E/C を使用した。また、蛍光の測定は基板をスライドガラス上に置き、50 mmol/L リン酸緩衝液 ($pH=7.0$ 、100 mmol/L NaCl を含む) を適宜滴下した後、カバーガラスで覆った状態で行った。

【 0 0 3 8 】

図 2 に蛍光の測定値を示した。図 2 の四角形の外部の蛍光値 (11330) はフルオロセインを直接結合したマトリクス部位からのものである。図 2 から最終的に結合されたオリゴヌクレオチドからの蛍光値は 2940 から 10350 の範囲に渡ることがわかる。これは各オリゴヌクレオチドプローブの量の指標に用いることができ、ハイブリダイゼーションの結果をこれらの蛍光値で補正すれば良いことになる。また、複数の DNA アレイを用いる場合には、各アレイの直接結合されフルオロセインからの蛍光値によりマトリクス部位間の補正を行うことが可能である。

【 0 0 3 9 】

(実施例 3) 実施例 1 で合成した DNA プローブアレイによる標的 DNA の定量。

【 0 0 4 0 】

図 3 にハイブリダイゼーションに用いたテトラメチルローダミン標識モデル標的 DNA の構造を示す。前述のようにこの標的 DNA の塩基配列は配列 No. 65 である。

【 0 0 4 1 】

上記基板を BSA (牛血清アルブミン、シグマアルドリッチジャパン) を 2% の濃度で含む 50 mmol/L リン酸緩衝液 ($pH=7.0$ 、100 mmol/L NaCl を含む) に 1 時間浸漬した後、上記緩衝液で適宜洗浄した後のハイブリダイゼーションに用

いた。

【0042】

ハイブリダイゼーションは上記の標的DNAを 50nmol/Lの濃度で含む 100mmol/L NaCl、50mmol/Lリン酸緩衝液(pH=7.0) 2mLとDNAプローブアレイ基板をハイブリダイゼーション用の樹脂パックに封じ、70℃に加熱した後、20℃まで冷却し、その後その状態で24時間放置することによりおこなった。

【0043】

次に基板を上記緩衝液中で20分間洗浄した後に標的DNAのテトラメチルローダミンからの蛍光を実施例2と同様の方法で定量した。なお、蛍光フィルターブロックにはY-2E/Cを使用した。また、イメージインテンシファイヤーの増幅度は4.0である。

【0044】

結果を図4に示す。また、図4の定量値に補正值(伸長反応を行なわないマトリクス部位に直接結合したフルオロセインからの蛍光値:11330/伸長反応を行なった各マトリクス部位のフルオロセインからの蛍光値)を掛け合わせた値を図5に示した。これらの値を比較例の値と比較する(後記)。

【0045】

(比較例1) インクジェット法による既合成DNAプローブの基板への供給と結合、及び、ハイブリダイゼーション

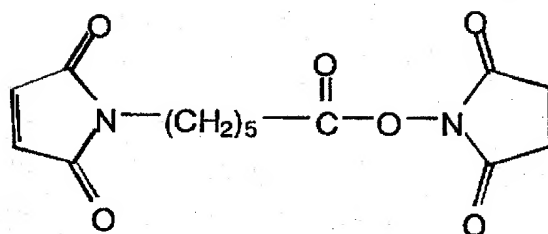
実施例1と同様にガラス基板を洗浄した後、減圧蒸留して精製したアミノシランカップリング剤(KBM-603 信越化学工業株式会社)を1%の濃度で含む水溶液を室温下、1時間攪拌し、メトキシ基部分を加水分解させた。次に上記基板を洗浄後速やかに上記シランカップリング剤水溶液に室温下、1時間浸漬し、流水(超純水)洗浄後、窒素ガスを吹きつけて乾燥させ、次いで、120℃のオーブン中で1時間加熱定着させた。

【0046】

冷却後、N-(6-マレイミドカプロキシ)スクシイミド(EMCS,化合物I,同仁化学研究所)

【0047】

【化1】



化合物 I

【0048】

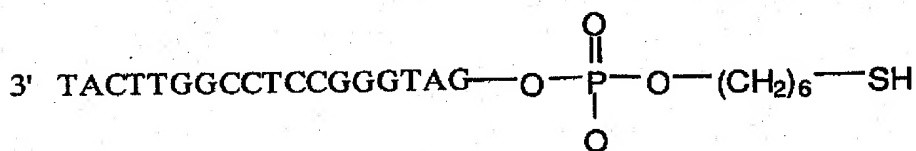
の 0.3% 溶液 (エタノール; ジメチルスルホキシド = 1:1) に基板を室温下、2 時間浸漬し、反応させたのち、エタノール: ジメチルスルホキシド = 1:1 で 1 回、エタノールで 3 回洗浄し、窒素ガスを吹きつけて乾燥させた。この処理によりガラス基板上のシランカップリング剤のアミノ基と EMCS のスクシイミド基が結合し、表面にマレイミド基が生成したことになる。このマレイミド基と DNA プローブのチオール基が結合する (後記)。

【0049】

実施例 3 と全く同様の塩基配列を有する 64 種の DNA プローブをベックス株式会社より購入した。これらの DNA には基板に結合するために 5' 末端にチオールリンカーを担持させてある。チオールリンカーを有する DNA の例を化合物 II

【0050】

【化2】



化合物 II

【0051】

としてあげた。ちなみに化合物 II はモデル標的 DNA に対して完全に相補的な塩

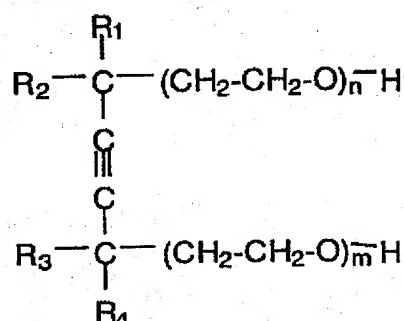
基配列(No. 4 2)を有するものである。

【0 0 5 2】

これらのDNAをサーマルジェットプリンターで吐出するための溶媒、すなわち、グリセリン 7.5wt%、尿素 7.5wt%、チオジグリコール 7.5wt%、一般式III

【0 0 5 3】

【化 3】



一般式III

【0 0 5 4】

で示されるアセチレンアルコール(例えば、商品名:アセチレノールEH 川研ファインケミカル株式会社) 1 wt%を含む水溶液に、吸光度が 1.0 になるように溶解させ、0.4mLをサーマルジェットプリンター(キヤノン株式会社製のインクジェット用ヘッドを2個搭載可能)のインク供給部を改良して充填し、上記の基板上に吐出した。吐出のパターンは実施例1から3と同様である(形状は異なる)。装置の仕様上からは、吐出される液滴1滴の量は24 pLで、この条件では液滴1滴のしめるドットの直径は70~100 μmである。吐出密度は120dpi(ドット/インチ)である。この基板を、湿度100%の保湿チャンバー内に室温下で1時間反応させた後、流水(超純水)中で約30秒洗浄した。

【0 0 5 5】

BSAによる処理、ハイブリダイゼーションの条件、及び、蛍光定量の条件は実施例3と同様である。イメージインテンシファイヤーの増幅度は2.0である。蛍光定量の結果を図6に示した。

【0056】

図7には図6の結果と図5の結果の比較を示した。図5の各マトリクスの値を A_n 、図6の各マトリクスの値を $B_n(n=1\sim64)$ とすると、図7の各マトリクスの値 C_n は以下の(1)式で示される。

$$(1) \quad C_n = B_n \times (\sum A_n / \sum B_n) / A_n$$

($\sum A_n$ は A_n の総和、 $\sum B_n$ は B_n の総和を示す。)

図7の結果は本発明による逐次合成のDNAプローブアレイによるハイブリダイゼーションの結果をプローブの末端標識に用いた蛍光色素の蛍光値と、伸長反応を行なわないマトリクス部位の蛍光値とで補正した値と、予め合成、精製したDNAプローブを結合したDNAプローブアレイを用いたハイブリダイゼーションの結果を比較したものである。図7の数値は土約20%、標準偏差は約9%の範囲であり、本発明の補正方法が有効であることを示している。また、DNAプローブアレイ基板相互の補正も伸長反応を行なわないマトリクス部位において、直接基板に結合した蛍光色素(フルオロセイン)の値により可能である。

【0057】

【発明の効果】

本発明の逐次合成におけるプローブアレイの合成において、末端に標識を施すことにより、各マトリクス間のプローブ量を把握することが可能となり、また、各プローブ量を補正して標的物質を検出、定量することが可能となった。また、各プローブ基板に直接標識物質を結合することにより、各プローブアレイ間の補正も可能となった。

【0058】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<120> Probe array.

<130> 3906114

<160> 81

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 1

gatgggactc aagttcat

18

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 2

gatgggactc aggttcat

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 3

gatgggactc acgttcat

18

<210> 4

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 4

gatgggactc atgttcat

18

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 5

gatgggactc gagttcat

18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 6

gatgggactc gggttcat

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 7

gatgggactc gcgttcat

18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 8

gatgggactc gtgttcat

18

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 9

gatgggactc cagttcat

18

<210> 10

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 10

gatgggactc cggttcat

18

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 11

gatgggactc ccgttcat

18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 12

gatgggactc ctgttcat

18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 13

gatgggactc tagttcat

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 14

gatgggactc tggttcat

18

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 15

gatgggactc tcgttcat

18

<210> 16

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 16

gatgggactc ttgttcat

18

<210> 17

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 17

gatggggctc aagttcat

18

<210> 18

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 18

gatggggctc aggttcat

18

<210> 19

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 19

gatggggctc acgttcat

18

<210> 20

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 20

gatggggctc atgttcat

18

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 21

gatggggctc gagttcat

18

<210> 22

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 22

gatggggctc gggttcat

18

<210> 23

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 23

gatggggctc gcgttcat

18

<210> 24

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 24

gatggggctc gtgttcat

18

<210> 25

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 25

gatggggctc cagttcat

18

<210> 26

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 26

gatggggctc cggttcat

18

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 27

gatggggctc ccgttcat

18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 28

gatggggctc ctgttcat

18

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 29

gatggggctc tagttcat

18

<210> 30

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 30

gatggggctc tggttcat

18

<210> 31

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 31

gatggggctc tcgttcat

18

<210> 32

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 32

gatggggctc ttgttcat

18

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 33

gatgggcctc aagttcat

18

<210> 34

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 34

gatgggcctc aggttcat

18

<210> 35
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 35

gatgggcctc acgttcat

18

<210> 36

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 36

gatgggcctc atgttcat

18

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 37

gatgggcctc gagttcat

18

<210> 38

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 38

gatgggcctc gggttcat

18

<210> 39

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 39

gatgggcctc gcgttcat

18

<210> 40

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 40

gatgggcctc gtgttcat

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 41

gatgggcctc cagttcat

18

<210> 42

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 42

gatgggcctc cggttcat

18

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 43

gatgggcctc ccgttcat

18

<210> 44

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 44

gatgggcctc ctgttcat

18

<210> 45

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 45

gatgggcctc tagttcat

18

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 46

gatgggcctc tggttcat

18

<210> 47

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 47

gatgggcctc tcgttcat

18

<210> 48

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 48

gatgggcctc ttgttcat

18

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 49

gatgggtctc aagttcat

18

<210> 50

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 50

gatgggtctc aggttcat

18

<210> 51

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 51

gatgggtctc acgttcat

18

<210> 52

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 52

gatgggtctc atgttcat

18

<210> 53

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 53

gatgggtctc gagttcat

18

<210> 54

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 54

gatgggtctc gggttcat

18

<210> 55

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 55

gatgggtctc gggttcat

18

<210> 56

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 56

gatgggtctc gtgttcat

18

<210> 57

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 57

gatgggtctc cagttcat

18

<210> 58

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 58

gatgggtctc cggttcat

18

<210> 59

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 59

gatgggtctc ccgttcat

18

<210> 60

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 60

gatgggtctc ctgttcat

18

<210> 61

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 61

gatgggtctc tagttcat

18

<210> 62

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 62

gatgggtctc tggttcat

18

<210> 63

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 63

gatgggtctc tcgttcat

18

<210> 64

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 64

gatgggtctc ttgttcat

18

<210> 65

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 65

atgaaccgga ggcccatc

18

<210> 66

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 66

gatgggactc angttcat

18

<210> 67

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 67

gatgggactc gngttcat

18

<210> 68

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 68

gatgggactc cngttcat

18

<210> 69

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 69

gatgggactc tngttcat

18

<210> 70

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 70

gatggggctc angttcat

18

<210> 71

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 71

gatggggctc gngttcat

18

<210> 72

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 72

gatggggctc cngttcat

18

<210> 73

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 73

gatggggctc tngttcat

18

<210> 74

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 74

gatgggcctc angttcat

18

<210> 75

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 75

gatgggcctc gngttcat

18

<210> 76

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 76

gatgggcctc cngttcat

18

<210> 77

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 77

gatgggcctc tngttcat

18

<210> 78

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 78

gatgggtctc angttcat

18

<210> 79

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 79

gatgggtctc gngttcat

18

<210> 80

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 80

gatgggtctc cngttcat

18

<210> 81

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Synthesized

<400> 81

gatgggtctc tngttcat

18

【図面の簡単な説明】

【図 1】

標的DNA塩基配列とプローブ塩基配列およびアレイ基板上での配置

【図 2】

実施例 2 の DNA プローブアレイのフルオロセイン由来の蛍光測定値

【図 3】

標的DNAの構造

【図 4】

実施例 3 のハイブリダイゼーションの結果

【図 5】

実施例 3 のハイブリダイゼーションの結果の補正值

【図 6】

比較例のハイブリダイゼーションの結果

【図 7】

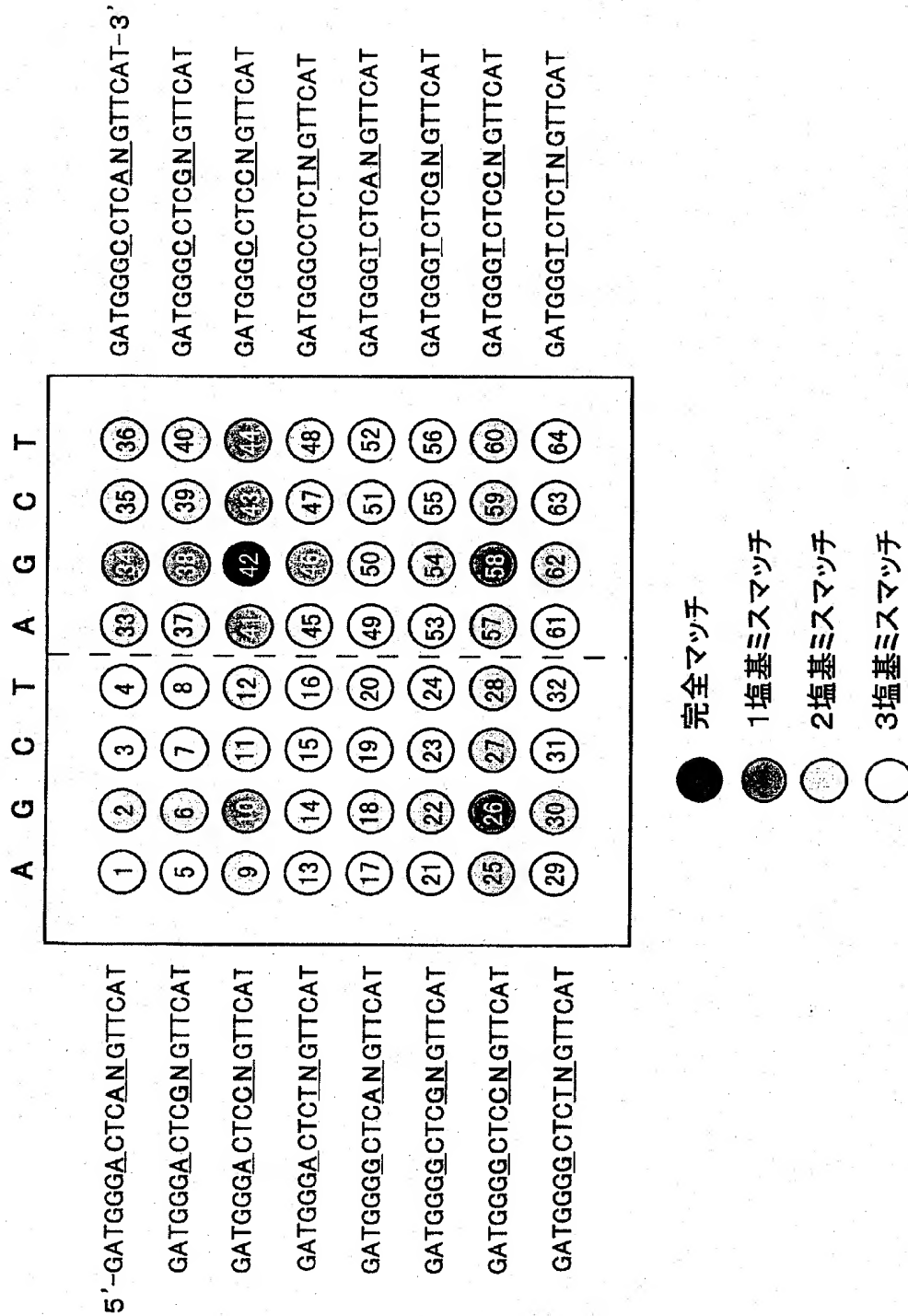
実施例 3 の補正值と比較例の結果の比較

【書類名】

図面

【図 1】

標的DNA塩基配列 No.65 5'-ATGAACCGGAGGCCCATC-3'

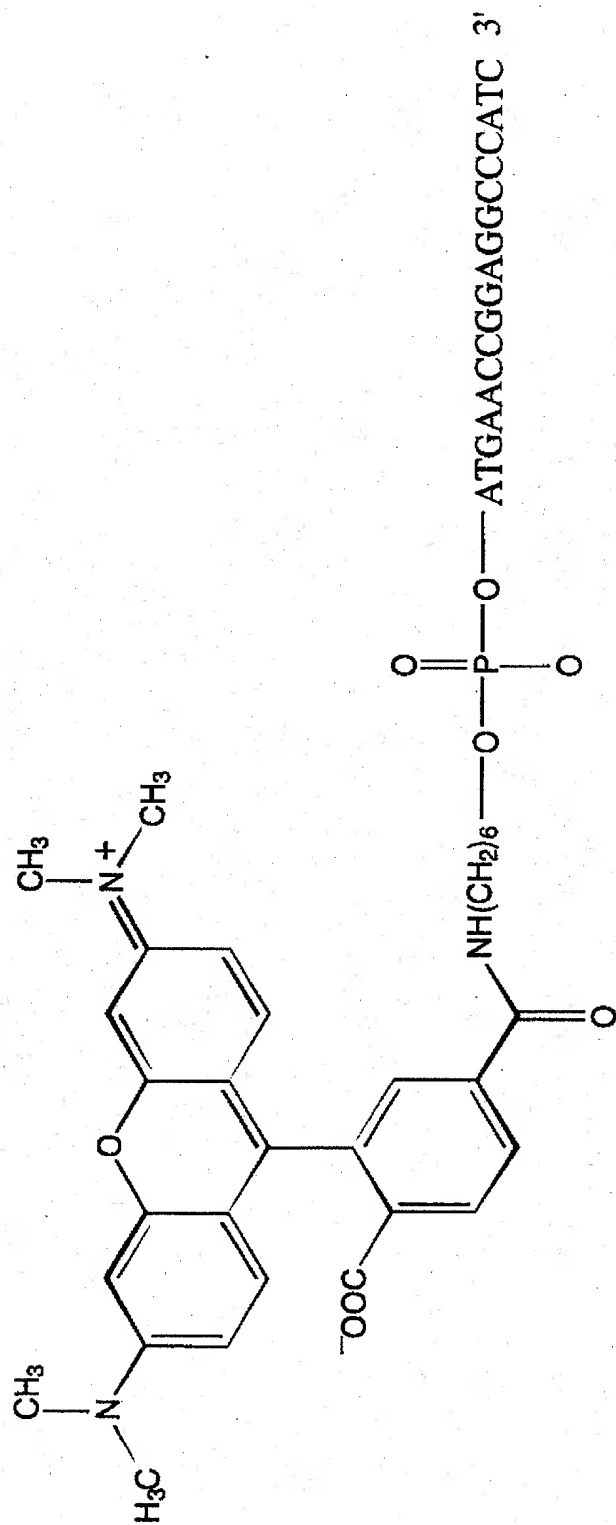


【図2】

4970	4250	5570	4980	6980	3390	6090	6280
8300	5720	9710	8250	6710	6710	6840	6130
4590	3740	7770	6580	5390	4690	4070	9740
4490	7410	5860	4500	2940	6450	4070	7310
5384	7880	5000	9910	8520	6060	5900	3570
6640	5540	6750	5400	10216	6350	7700	5160
6980	5170	8250	8410	7760	4000	8460	3190
6690	4830	8200	7860	10350	4460	4970	2990

11330

【図3】



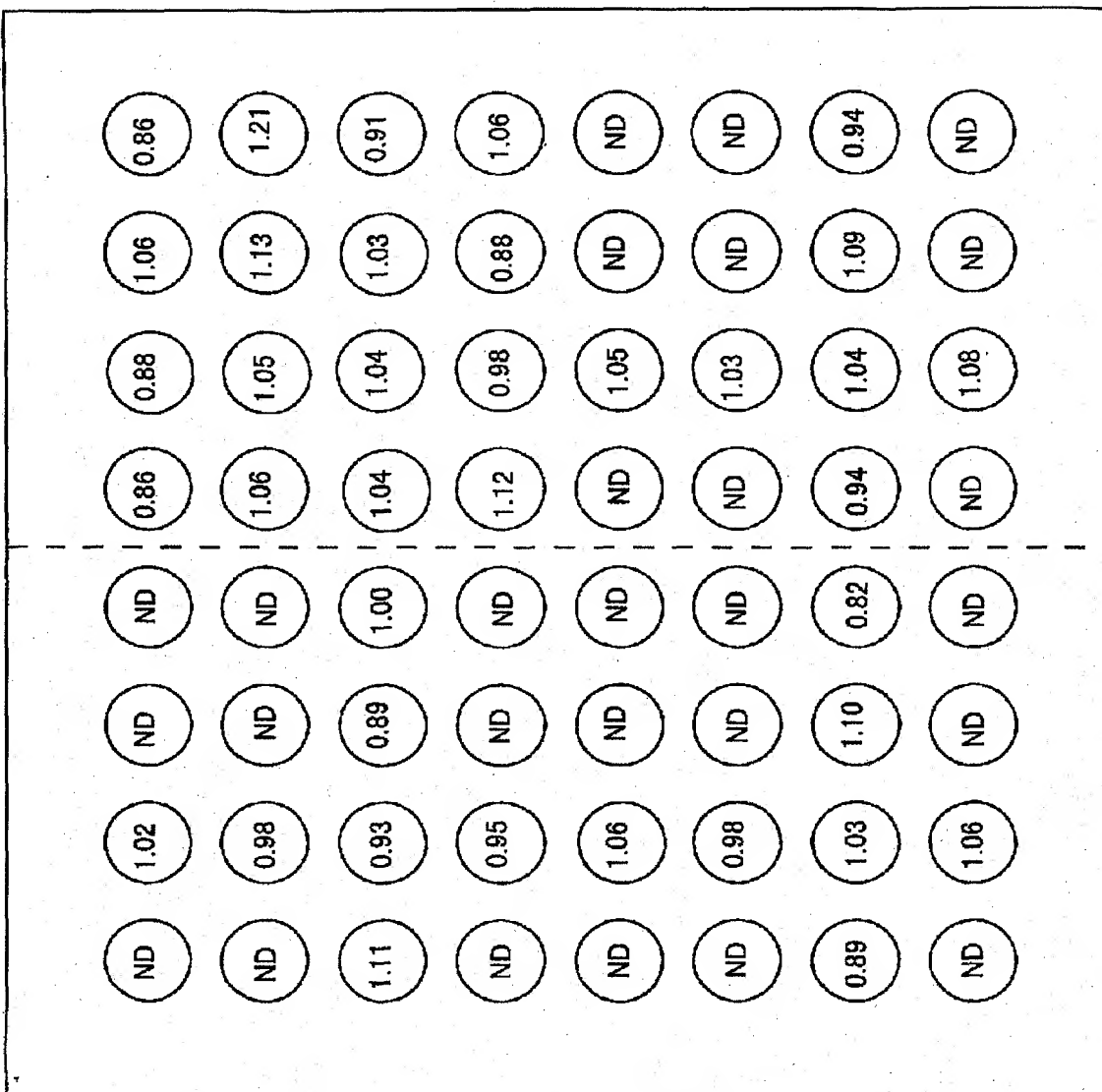
【図 4】

700	400	3290	880	ND	ND	230	ND
1130	900	3250	1070	ND	ND	250	ND
3090	780	3950	2470	3780	1500	4100	1170
660	1500	2500	1610	ND	ND	260	ND
ND	ND	640	ND	ND	ND	230	ND
ND	ND	790	ND	ND	ND	290	ND
2010	1660	4030	2280	1570	1910	2380	860
ND	ND	660	ND	ND	ND	600	ND

【図 5】

ND	2740	ND	1340	1390	5270	1830	1190
ND	3290	ND	ND	2160	1600	1970	940
ND	4700	1150	1240	5570	6630	4460	4550
ND	3130	ND	ND	1840	5180	1440	1270
ND	2650	ND	ND	ND	4190	ND	ND
ND	3230	ND	ND	ND	2680	ND	ND
1120	3940	810	640	500	6030	330	520
ND	1590	ND	ND	ND	2570	ND	ND

【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブアレイの逐次的な合成における合成収率の低さに起因する、標的物質を検出する際の感度の低下、信頼性の低下を克服し、高感度で信頼性の高い検出が可能な合成方法と検出方法を提供する。

【解決手段】 逐次合成の最終段階において、それまでの各段階の合成によって伸長されたプローブの末端に標識化合物を結合することによって作製された末端標識プローブアレイとその合成方法。さらに、それぞれのマトリクスの標識物質量を測定する、最終段階まで逐次合成された各マトリクスのプローブの量の評価方法。

【選択図】 図 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001007]

1. 変更年月日 1990年 8月30日

[変更理由] 新規登録

住 所 東京都大田区下丸子3丁目30番2号

氏 名 キヤノン株式会社